



⑮ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift

⑩ DE 195 16 776 A 1

⑳ Aktenzeichen: 195 16 776.7
㉔ Anmeldetag: 10. 5. 95
㉕ Offenlegungstag: 14. 11. 96

⑤ Int. Cl.:

C 12 N 15/11

C 12 N 1/00
C 12 N 5/10
C 07 K 14/435
C 07 K 16/18
A 61 K 48/00
A 61 K 39/395
A 01 K 67/027
G 01 N 33/50

DE 195 16 776 A 1

㉗ Anmelder:

Boehringer Ingelheim International GmbH, 55218
Ingelheim, DE

㉘ Erfinder:

Jenuwein, Thomas, Dr., Wien, AT; Laible, Götz, Dr.,
Wien, AT

㉙ Chromatin-Regulatorgene

⑤ Die Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, spielt eine Rolle bei bestimmten Krebserkrankungen. Diese Gene können somit, insbesondere die SET-Domäne als solche, als Grundlage für die Diagnose und Therapie dieser Erkrankungen dienen.

DE 195 16 776 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Gene, die eine Rolle bei der Regulation von Chromatin spielen, und ihre Verwendung für die Therapie und Diagnostik.

Die funktionelle Organisation von eukaryotischen Chromosomen in Centromere, Telomere sowie in eu- und heterochromatische Regionen stellt einen entscheidenden Mechanismus zur Gewährleistung der genauen Replikation und Verteilung der genetischen Information bei jeder Zellteilung dar. Im Gegensatz dazu sind Tumorzellen häufig durch chromosomale Rearrangements, Translokationen und Aneuploidie charakterisiert (Solomon et al., 1991; Pardue, 1991). Obwohl die Mechanismen, die zu einer erhöhten Chromosomeninstabilität in Tumorzellen führen, noch nicht geklärt sind, haben es in jüngster Zeit eine Reihe von experimentellen Systemen, beginnend mit telomerischen Positionseffekten in Hefe (Renault et al., 1993; Buck und Shore, 1995; Allshire et al., 1994), über Positionseffekt-Variation (PEV) in *Drosophila* (Reuter und Spierer, 1992), bis zur Analyse von Translokationsbruchpunkten in humanen Leukämien (Solomon et al., 1991; Cleary, 1991), ermöglicht, einige chromosomale Proteine zu identifizieren, die an der deregulierten Proliferation ursächlich beteiligt sind.

Erstens wurde festgestellt, daß die Überexpression einer verkürzten Version des SIR4-Proteins zu einer verlängerten Lebensdauer in Hefe führt (Kennedy et al., 1995). Da SIR-Proteine zum Entstehen multimerer Komplexe an den sogenannten "Matting Type Loc" und am Telomer beitragen, könnte es sein, daß überexprimiertes SIR4 mit diesen heterochromatinartigen Komplexen interferiert, was schließlich zu einer unkontrollierten Proliferation führt. Diese Annahme steht im Einklang mit der Häufigkeit des Auftretens einer deregulierten Telomerenlänge in den meisten humanen Krebsarten (Counter et al., 1992).

Zweitens wurden mittels genetischer Analysen von PEV in *Drosophila* eine Reihe von Genprodukten identifiziert, die die Chromatinstruktur an heterochromatischen Positionen und innerhalb des homeotischen Genclusters verändern (Reuter und Spierer, 1992). Mutationen einiger dieser Gene, wie modulo (Garzino et al., 1992) und polyhomeotic (Smouse und Perrimon, 1990), können in *Drosophila* die deregulierte Zellproliferation oder den Zelltod verursachen. Drittens wurden Säugertierhomologe von sowohl Aktivatoren (trithorax oder trx-Gruppe) als auch Repressoren (z. B. polycomb oder Pc-Gruppe) der Chromatinstruktur von homeotischen *Drosophila*-Selektorgenen beschrieben. Unter diesen hat sich von humanen HRX/ALL-1 (trx-Gruppe) gezeigt, daß es an der durch Translokation induzierten Leukämogenese beteiligt ist (Tkachuk et al., 1992; Gu et al., 1992), und daß die Überexpression des Maus-bmi (Pc-Gruppe) zum Entstehen von Lymphomen führt (Haupt et al., 1991; Brunk et al., 1991; Alkema et al., 1995). Ein Modell für die Funktion chromosomaler Proteine läßt darauf schließen, daß diese multimeren Komplexe bilden, welche in Abhängigkeit von der Ausgewogenheit zwischen Aktivatoren und Repressoren im Komplex den Kondensationsgrad der umliegenden Chromatinregion bestimmen (Locke et al., 1988). Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts durch Überexpression einer der Komponenten des Komplexes zeigte eine Neuverteilung von eu- und heterochromatischen Regionen (Buck und Shore, 1995; Reuter und Spierer, 1992; Eisenberg et al., 1992). Dieser Dosisseffekt kann die Chromatinstruktur an vorbestimmten Loci destabilisie-

ren, was letztlich zu einem Übergang vom normalen zum transformierten Zustand führt.

Trotz der Charakterisierung von HRX/ALL-1 und bmi als Protoonkogene, die die Chromatinstruktur verändern können, ist das Wissen über Säugertiergenprodukte, welche mit Chromatin wechselwirken, noch sehr beschränkt. Im Gegensatz dazu wurden durch genetische Analysen von PEV in *Drosophila* ca. 120 Allele für Chromatinregulatoren beschrieben (Reuter und Spierer, 1992). Kürzlich wurde eine carboxyterminale Region mit Ähnlichkeit in der Sequenz identifiziert, die einem positiven (trx, trx-Gruppe) und einen negativen (E(z), Pc-Gruppe) *Drosophila*-Chromatinregulator (Jones und Gelbart, 1993) gemeinsam ist. Darüberhinaus ist dieser Carboxyterminus auch in Su(var)3-9, einem dominanten Suppressor der Chromatinverteilung in *Drosophila*, konserviert (Tschiersch et al., 1994).

Bei der vorliegenden Erfindung wurde von der Überlegung ausgegangen, daß diese als "SET" bezeichnete Proteindomäne (Tschiersch et al., 1994) wegen ihrer evolutionären Konservierung und dem Vorhandensein in antagonistischen Genprodukten eine neue Genfamilie entwicklungsgeschichtlich wichtiger Säugtier-Chromatinregulatoren definiert. Darüberhinaus trägt die Charakterisierung weiterer Mitglieder der Gruppe von SET-Domäne-Genen, neben HRX/ALL-1, zur Aufklärung der Mechanismen bei, die dafür verantwortlich sind, daß strukturelle Veränderungen im Chromatin zur malignen Transformation führen können.

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, humane Chromatinregulatoren zu identifizieren, ihre Funktion aufzuklären und sie für die Diagnostik und Therapie einzusetzen.

Zur Lösung dieser Aufgabe wurde zunächst die Sequenzinformation der SET-Domäne benutzt, um aus humanen cDNA-Banken die zu den SET-Domäne-Genen von *Drosophila* homologen humanen cDNAs zu erhalten. Es wurden zwei cDNAs erhalten, die Humanhomologe von E(z) bzw. Su(var)3-9 darstellen; die entsprechenden humanen Gene wurden als HEZ-2 und H3-9 bezeichnet (vgl. unten); außerdem wurde eine variante Form von HEZ-2 identifiziert, die als HEZ-1 bezeichnet wurde.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit DNA-Moleküle, enthaltend eine für ein Chromatinregulator-Protein, das eine SET-Domäne aufweist, kodierende Sequenz oder eine Teilssequenz davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie in die Fig. 6 oder in Fig. 7 dargestellte Nukleotidsequenz aufweisen. Die erfindungsgemäßen DNA-Moleküle werden im folgenden auch als "erfindungsgemäße Gene" bezeichnet.

Die erfindungsgemäßen Gene tragen die Bezeichnung HEZ-2 und H3-9.

Die Erfindung betrifft in einem weiteren Aspekt die von diesen Genen abgeleiteten cDNAs, einschließlich ihrer degenerierten Varianten; Mutanten, die für funktionelle Chromatinregulatoren kodieren sowie Varianten, die auf eine Genduplikation zurückzuführen sind; ein Beispiel dafür ist HEZ-1, dessen Sequenz im Vergleich mit HEZ-2 in Fig. 8 dargestellt ist.

Zur Lösung der im Rahmen der vorliegenden Erfindung gestellten Aufgabe wurde im einzelnen wie folgt vorgegangen: Ausgehend von der Sequenzinformation von der konservierten SET-Domäne, wurde unter reduzierter Stringenz eine humane B-Zell-spezifische cDNA-Bibliothek mit einer gemischten *Drosophila*-DNA-Sonde, die für die SET-Domänen von E(z) und Su(var)3-9 kodiert, gescreent. Aus 500.000 Plagues

wurden 40 primäre Phagen ausgewählt. Nach zwei weiteren Runden Screening zeigte sich, daß 31 Phagen für authentische E(z)-Sequenzen kodieren und daß fünf Phagen E(z)-Varianten darstellen. Im Gegensatz dazu hybridisierten nur zwei Phagen mit der Sonde, die die SET-Domäne von Su(var)3-9 allein enthielt. Die Phageninserts wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und mittels Restriktionskartierung und Teilssequenzierung analysiert. Repräsentative cDNA-Inserts wurden

subkloniert und über ihre ganze Länge sequenziert. Die 5'-Enden wurden isoliert, indem positive Phagen noch einmal mit 5'-DNA-Sonden gescreent wurden, worauf nach Subklonierung komplette cDNAs erhalten wurden.

Die komplette, für das humane Homologe von E(z) kodierende cDNA wurde als HEZ-2 und die DNA, die für das humane Homologe von Su(var)3-9 kodiert, wurde als H3-9 bezeichnet. Insgesamt beträgt die Identität der Aminosäuren zwischen Drosophila und den humanen Proteinen 61% für HEZ-2 und 43% für H3-9, wobei die C-terminale SET-Domäne sehr hoch konserviert ist (88% für HEZ-2 und 53% für H3-9). Der Sequenzvergleich zeigte weitere deutliche Homologieregionen, z. B. eine Cystein-reiche Domäne in HEZ-2 und eine Chromo-Box in H3-9. (In polycomb wurde gezeigt, daß die Chromo-Box die für die Wechselwirkung zwischen DNA und Chromatin wesentliche Domäne ist; Messmer et al., 1992). Im Gegensatz dazu fehlen die 207 Aminosäuren, die das aminotermale GTP-Bindungsmotiv des Drosophila-Proteins enthalten, im putativen humanen Homologen H3-9.

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenzen zwischen den Drosophila- und den humanen Genen ist in den Fig. 1 und 2 dargestellt:

Fig. 1 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenz zwischen HEZ-2 und von Drosophila-enhancer von zeste (E(z)). Identische Aminosäuren der konservierten carboxyterminalen SET-Domäne (schattierte Box) und der Cys-reichen Region (Cys-Reste sind hervorgehoben) sind gezeigt. Die mutmaßlichen Kernlokalisierungssignale sind unterstrichen.

Fig. 2 zeigt den Vergleich der Aminosäure-Sequenz zwischen dem humanen Homologen H3-9 und Drosophila-Su(var)3-9. Identische Aminosäuren der konservierten carboxyterminalen SET-Domäne (schattierte Box) und der Chromo-Domäne (dunkle schattierte Box) sind dargestellt. Die mutmaßlichen Kernlokalisierungssignale sind unterstrichen. Oben in der Figur ist eine schematische Übersicht der beiden Proteinstrukturen dargestellt, die zeigt, daß im humanen Homologen 207 Aminosäuren am N-Terminus fehlen.

Da translationale Consensussequenzen in Umgebung des Start-ATG der humanen H3-9-cDNA auch an der entsprechenden internen Position in Su(var)3-9 vorhanden sind, dürfte das Drosophila-Protein zusätzliche Exons enthalten, die in einem späteren Stadium der Evolution für die Funktion entbehrlich wurden. (Die Richtigkeit dieser Hypothese kann bestätigt werden, indem die humane H3-9-cDNA und komplette oder am 5'-Ende verkürzte cDNAs von Su(var)3-9 in Drosophila exprimiert werden. Es wurde eine weitere cDNA der Bezeichnung MG-44 beschrieben (s. unten), der ebenfalls das 5'-Ende fehlt.)

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführte DNA-Blot-Analysen deuten darauf hin, daß HEZ und H3-9 in der Maus von einzelnen Genen repräsentiert werden, während im Menschen HEZ-Sequenzen durch

zwei getrennte Loci kodiert werden. Der zweite HEZ-Locus (als HEZ-1 bezeichnet) wurde auch durch Charakterisierung einer kleinen Anzahl von cDNA-Varianten, die sich in ihren 3'-flankierenden Sequenzen von der Mehrzahl der aus der humanen cDNA-Bibliothek isolierten HEZ-Klone unterscheiden, bestätigt. Die Unterschiede zwischen HEZ-2 und HEZ-1 im sequenzierten Bereich sind in Fig. 8 dargestellt: Die SET-Domäne von HEZ-1 zeigt gegenüber HEZ-2 Mutationen; außerdem hat HEZ-1 in der SET-Domäne ein Stopodon, das das Protein um die 47 C-terminalen Aminosäuren verkürzt. In Fig. 8 ist die Nukleotidsequenz der HEZ-2-cDNA von Position 1844 bis 2330 in der jeweils oberen Zeile dargestellt, wobei das authentische Stopodon unterstrichen ist. Um eine Teilsequenz der cDNA der HEZ-1-Variante der HEZ-2-Sequenz zuzuordnen, wurde das gap-Programm des Wisconsin GCG Netzwerkservice verwendet. Das vorzeitige Stopodon in HEZ-1 (Position 353) ist unterstrichen. Sequenzen, die für die konservierte SET-Domäne kodieren, sind hervorgehoben. Außerdem ist das 3'-Ende (Position 151 in HEZ-1) des aberranten Transkripts B52 (s. unten) dargestellt. Über die verfügbare Sequenz zeigt sich B52 zu 97% identisch mit HEZ-1 und zu 72% identisch mit HEZ-2. Der Sequenzvergleich von HEZ-1 mit HEZ-2 sowie die Feststellung, daß beim Menschen im Gegensatz zur Maus zwei getrennte HEZ-Loci auftreten, lassen darauf schließen, daß beim Menschen eine Genduplikation aufgetreten sein dürfte.

In einem Vergleich mit cDNA-Sequenzen in der Datenbank GeneBank wurde überraschend festgestellt, daß bestimmte in der Datenbank eingetragene cDNA-Teilsequenzen, die von aberranten Transkripten in Tumorgewebe abgeleitet sind, mutierte Versionen der erfindungsgemäßen cDNAs darstellen:

Einerseits war auf der Suche nach BRCA1, einem Gen, das für Brust- und Eileiterkrebs prädisponiert, eine partielle cDNA-Sequenz mit 271 Nukleotiden der Bezeichnung B52, die für eine mutierte Variante der SET-Domäne kodiert, isoliert und auf dem humanen Chromosom 17q21 kartiert worden (Friedman et al., 1994). Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschend festgestellt, daß B52 97% Identität mit der erfindungsgemäßen HEZ-1-cDNA-Variante aufweist (vgl. oben); möglicherweise stellt HEZ-1 ein Pseudogen dar, dessen Reaktivierung bei der deregulierten Proliferation eine Rolle spielt.

Andererseits war eine cDNA (2800 Nukleotide; MG-44) vom humanen Chromosom Xp11 isoliert worden (Geraghty et al., 1993), einer Region, die für degenerative Störungen der Netzhaut und Synovialsarkome prädisponiert. Es wurde überraschend festgestellt, daß diese cDNA 98% Identität mit der erfindungsgemäßen H3-9-cDNA aufweist. (Der Sequenzvergleich der H3-9-cDNA mit ihrer mutierten Version MG-44 zeigt, daß diese ebenfalls nicht das am 5'-Ende gelegene GTP-Bindungsmotiv des Drosophila-Homologen aufweist.)

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung bereitgestellten neuen Gene ermöglichen es somit erstmals, einen Zusammenhang zwischen bestimmten Krebserkrankungen und Mutationen in Chromatinregulatoren herzustellen; im Falle der MG-44-cDNA konnte, da diese mehrere Punkt- und Frameshift-Mutationen aufweist, welche die Chromo- und SET-Domänen unterbrechen, erst anhand der erfindungsgemäßen H3-9-cDNA ein Zusammenhang zwischen Su(var)3-9 und MG-44 aufgestellt werden.

Neben den bereits genannten Sequenzen sind in der

Sequenzdatenbank GeneBank als weitere humane Mitglieder der SET-Proteinfamilie das gut dokumentierte humane Homologe von *Drosophila trx*, HRX/ALL-1 (Tkachuk et al., 1992; Gu et al., 1992) eingetragen, ferner ein Gen unbekannter Funktion der Bezeichnung G9a, das im humanen Major Histocompatibility Complex (Milner und Campbell, 1993) vorhanden ist, drittens eine nicht publizierte cDNA (KG-1), die aus unreifen myeloiden Tumorzellen isoliert wurde (Nomura et al., 1994). Während G9a derzeit das einzige humane Gen mit einer SET-Domäne ist, für das bisher keine mutierte Version bekannt ist, trägt KG-1 eine Insertion von 342 Aminosäuren, welche die SET-Domäne in eine Amino- und eine Carboxyterminale Hälfte spaltet. Ob diese KG-1-cDNA das authentische Gen oder eine aberrante Version darstellt, ist unklar. Insgesamt sind vier der fünf derzeit bekannten humanen Mitglieder der SET-Proteinfamilie Änderungen unterworfen, die alle die SET-Domäne mutieren (HRX/ALL-1, HEZ-1/B52, MG-44 und KG-1). Darüberhinaus wurden in drei Fällen die entsprechenden humanen Genloci in der Nähe von Translokationsbruchpunkten oder instabilen chromosomalen Regionen kartiert (HRX/ALL-1, HEZ-1/B52 und MG-44). In Fig. 3 sind die aberranten Transkripte von humanen SET-Domäne-Genen dargestellt. Links in der Figur ist die Lage der fünf derzeit bekannten SET-Domäne-Gene auf dem jeweiligen Chromosom angegeben. U.a. sind die drei Gene (HRX/ALL-1, HEZ-1/B52 und MG-44) für die aberranten cDNAs auf Translokationsbruchpunkten oder instabilen Chromatinregionen kartiert worden, dargestellt. Vier der fünf dargestellten SET-Domäne-Gene weisen Mutationen auf, die alle die Carboxyterminale SET-Domäne unterbrechen, welche in der Figur durch die dunkle Box dargestellt ist. Eine Translokation verbindet die aminoterminalen Hälfte von HRX mit einer nicht korrelierten Gensequenz, die als gepunktete Box mit der Bezeichnung ENL dargestellt ist. Ein vorzeitiges Stopcodon verkürzt die SET-Domäne von HEZ-1/B52 Punkt- und Frameshift-Mutationen unterbrechen die Chromo- und SET-Domäne in MG-44. Eine große Insertion spaltet die SET-Domäne von KG-1 in zwei Hälften. Aberrante Transkripte sind derzeit für G9a nicht bekannt. Das Cystein-reiche Cluster in B52 ist als gepunktete Box dargestellt; in HRX/ALL-1 sind die Homologieregion zu Methyltransferasen als schraffierte Box und die A/T-Haken als vertikale Linien dargestellt. Die Namen der jeweiligen authentischen Gene sind rechts in der Figur angegeben.

Die Tatsache, daß ein Säugetiervon der SET-Proteinfamilie, HRX/ALL-1, mit translokationsinduzierter Leukämie im Zusammenhang gebracht wurde (Tkachuk et al., 1992; Gu et al., 1992), ist ein starker Hinweis dafür, daß Proteine mit SET-Domäne nicht nur wichtige Regulatoren der Entwicklung sind, die chromatinabhängige Veränderungen der Genexpression mitbestimmen, sondern daß sie, nach Mutation, auch die normale Zellproliferation stören.

Da alle bisher beschriebenen Mutationen die Primärstruktur der SET-Domäne unterbrechen, liegt die Vermutung nahe, daß es die SET-Domäne als solche ist, die eine entscheidende Rolle im Übergang vom normalen zum transformierten Zustand spielt. Eine wichtige Funktion für die SET-Domäne kann ferner aufgrund ihrer evolutionären Konservierung in Genprodukten, die von der Hefe bis zum Menschen auftreten, vermutet werden.

Fig. 4 zeigt die evolutionäre Konservierung von SET-Domäne-Proteinen: Unter Verwendung des tfasta-Pro-

gramms des Wisconsin GCG Netzwerkservice wurden Proteine und offene Leseramen mit Homologie zur SET-Domäne identifiziert. In der Figur ist eine repräsentative Auswahl von Hefe bis zum Menschen gezeigt. Ziffern geben Aminosäuren an. Die Carboxyterminale SET-Domäne ist durch eine schwarze Box dargestellt, Cys-reiche Regionen durch eine dunkel gepunktete Box, das GTP-Bindungsmotiv in Su(var)3-9 durch eine hellgepunktete Box und die Chromo-Domäne von Su(var)3-9 und H3-9 durch eine offene Box mit hellen Punkten. Eine Region mit Homologie zu Methyltransferase (*trx* und HRX) ist als schraffierte Box dargestellt. A/T-Haken ("A/T Hooks") sind durch vertikale Linien dargestellt. Eine weitere Ser-reiche Region (S in C26E6.10) und eine Glu-reiche Region (E in G9a) oder Ankyrin-Repeats (ANK in G9a) sind ebenfalls hervorgehoben. YHR119 (GeneBank Accession No. U00059) und C26E6.10 (GeneBank Accession No. U13875) sind offene Leseramen von kürzlich in die Datenbank eingetragenen Cosmiden ohne eine funktionelle Charakterisierung. Prozente geben die Gesamtheit der Aminosäure-Identitäten zwischen den humanen und den *Drosophila*-Proteinen an.

Fig. 5 zeigt die Übereinstimmung an Aminosäuren der SET-Domäne. Die SET-Domäne der in Fig. 4 dargestellten Gene wurde unter Verwendung des Pileup-Programms des Wisconsin GCG Netzwerkservice angeordnet. Für den Vergleich der KG-1-SET-Domäne wurde vor dem Pileup die große Aminosäure-Insertion, die die SET-Domäne in zwei Hälften spaltet, entfernt. Aminosäure-Positionen, die 8 von 10 Übereinstimmungen aufweisen, sind hervorgehoben.

Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellten Kriterien erweist sich eine Beteiligung der Gene, die eine SET-Domäne haben, an der chromatinabhängigen Entstehung der deregulierten Proliferation; diese Gene bzw. die davon abgeleiteten cDNAs sowie Teil- und mutierte Sequenzen können somit bei der Therapie und Diagnose von Erkrankungen, die auf eine derartige Proliferation zurückzuführen sind, eingesetzt werden:

Unterschiede im Transkriptionsniveau von SET-Domäne-RNAs zwischen normalen und transformierten Zellen können als diagnostischer Parameter für Erkrankungen herangezogen werden, in denen die Expression von SET-Domäne-Genen dereguliert ist:

So können Oligonukleotide, kodierend für die SET-Domäne als solche bzw. Teilschnitte davon, als diagnostischer Marker verwendet werden, um bestimmte Krebsarten, in denen die SET-Domäne mutiert ist, zu diagnostizieren. Für die detaillierte Analyse der Funktion der erfindungsgemäßen cDNAs oder Abschnitten davon im Hinblick auf den diagnostischen Einsatz von SET-Domäne-Gensequenzen wurden im Rahmen der vorliegenden Erfindung die homologen Maus-cDNAs von HEZ-2 und H3-9 isoliert. Bei Verwendung der Maus-HEZ-cDNA als spezifische DNA-Sonde in "nuclease S1 protection" Analysen zur Untersuchung der HEZ-2-Genaktivität während der normalen Mausentwicklung zeigte sich ein eher breites Expressionsprofil, das ähnlich dem von bmi (Haupt et al., 1991) ist. Die mit den Maussequenzen durchgeführten Analysen werden mit Humansequenzen ausgeweitet, um die RNA-Mengen und differenzierten Zellen in verschiedenen humanen Zellkultursystemen zu vergleichen. Um festzustellen, ob sich die SET-Domäne dementsprechend als diagnostischer Tumormarker für spezifische Krebserkrankungen

oder als genereller diagnostischer Parameter eignet, können gängige Methoden zur Bestimmung der RNA-Konzentration, die in einschlägigen Laborhandbüchern (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) beschrieben sind, wie Northern Blot, S1-Nuclease-Protection-Analyse oder RNA-Sequenz-Analyse, verwendet werden.

Um die Häufigkeit zu untersuchen, mit der die SET-Domäne spezifischen Mutationen unterliegt, können die SET-spezifischen DNA-Sonden zur Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (single strand conformation polymorphisms; SSCP; Gibbons et al., 1995) eingesetzt werden.

Krebsarten, bei denen SET-spezifische DNA-Sonden als diagnostischer Marker verwendet werden können, sind Brustkrebs (HEZ-2; Friedman et al., 1994), Synovialsarkom (H3-9; Geraghty et al., 1993) und Leukämien.

Aufgrund der Kenntnis der Nukleotidsequenz der SET-Domäne-Gene können die entsprechenden von der cDNA-Sequenz abgeleiteten Proteine, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, in rekombinanter Form hergestellt werden, indem die dafür kodierenden cDNAs in geeignete Vektoren inseriert und in Wirtssystemen exprimiert werden. Die für die Produktion rekombinanter Proteine verwendeten Techniken sind dem Durchschnittsfachmann geläufig und können einschlägigen Handbüchern (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) entnommen werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit in einem weiteren Aspekt rekombinante DNA-Moleküle, enthaltend die für HEZ-2, H3-9 oder HEZ-1 kodierende DNA sowie damit funktionell verbundene Expressionskontrollsequenzen, sowie die damit transformierten Wirtssystemen.

Die erfindungsgemäßen rekombinanten Proteine können eingesetzt werden, um die Wechselwirkung von SET-Domäne-Proteinen mit Chromatin bzw. mit anderen Mitgliedern von Heterochromatin-Komplexen zu analysieren; ausgehend von den dabei erhaltenen Erkenntnissen über die Wirkungsweise dieser Komplexe werden die sich im einzelnen ergebenden Möglichkeiten für das gezielte Eingreifen in die daran beteiligten Mechanismen definiert und können für therapeutische Anwendungen genutzt werden.

Untersuchungen, die der weiteren Analyse der Funktion der SET-Domäne dienen, werden z. B. durchgeführt, indem cDNAs, kodierend für humanes HEZ-2 bzw. H3-9 und versehen mit einem Epitop, gegen das Antikörper zur Verfügung stehen, in vitro sowie in Gewebekulturen exprimiert werden. Nach Immunpräzipitation mit den jeweiligen epitopspezifischen Antikörpern kann festgestellt werden, ob HEZ-2 und H3-9 miteinander in vitro wechselwirken können und ob in vivo eine Komplexbildung zwischen HEZ-2 und/oder H3-9 mit weiteren Chromatinregulatoren stattfindet.

Es wurde bereits von anderen Autoren angenommen (DeCamillis et al., 1992; Rastelli et al., 1993; Orlando und Paro, 1993), daß eine Komplexbildung zwischen verschiedenen Mitgliedern von Heterochromatinproteinen wesentlich für deren Funktion ist. Aufgrund der Verfügbarkeit der erfindungsgemäßen SET-Domäne-Gene kann festgestellt werden, ob die SET-Region eine Domäne darstellt, die aufgrund von Wechselwirkungen funktioniert, oder ob sie zum Entstehen multimerer heterochromatischer Komplexe beiträgt. Ebenso kann festgestellt werden, ob die SET-Domäne eine inhibitorische Funktion hat, ähnlich der aminoterminalen BTB-

Domäne verschiedener Chromatinregulatoren, einschließlich des GAGA-Faktors (Adams et al., 1992). Insgesamt erlauben die Analysen von Wechselwirkungen mit Epitop-versehene HEZ-2- und H3-9-Proteine eine weitere Charakterisierung der Funktion der SET-Domäne. Dadurch werden Möglichkeiten eröffnet, gegen die deregulierte Aktivität vorzugehen, indem z. B. mittels gentherapeutischer Methoden dominant-negative Varianten der SET-Domäne-cDNA-Sequenzen in die Zelle eingeführt werden. Derartige Varianten werden z. B. erhalten, indem zunächst die funktionellen Domänen der SET-Proteine definiert werden, z. B. die für die DNA/Chromatin- oder die für die Protein/Protein-Wechselwirkung verantwortlichen Sequenzabschnitte, und indem dann die um die jeweilige(n) Domäne(n) oder um Abschnitte davon verkürzten DNA-Sequenzen in der betroffenen Zelle zur Expression gebracht werden, um eine durch das intakte funktionelle Protein verursachte Deregulation der Proliferation zu kompetitieren.

Die Verfügbarkeit der erfindungsgemäßen cDNAs erlaubt ferner die Herstellung transgener Tiere, z. B. Mäuse, in denen SET-Domäne-Gene entweder überexprimiert werden können ("gain-of-function") oder in denen diese Gene ausgeschaltet werden können ("loss-of-function"); für letztere Analysen werden die korrespondierenden Tiersequenzen, insbesondere Mausequenzen, der erfindungsgemäßen Gene eingesetzt.

Insbesondere gibt die "gain-of-function"-Analyse, bei der die Allele der erfindungsgemäßen Gene in die Maus eingeführt werden, letztlich Aufschluß über die ursächliche Beteiligung von HEZ-2 und H3-9 an der chromatinabhängigen Förderung der Tumorentstehung. Für die "gain-of-function"-Analyse können die kompletten cDNA-Sequenzen von humanem HEZ-2 und H3-9 sowie deren mutierte Versionen, wie HEZ-1/B52 und MG-44, mittels Vektoren, die hohe Expressionsraten ermöglichen, z. B. Plasmiden mit dem humanen β -Actin-Promotor, getrieben sowohl vom Enhancer der schweren Kette von Immunglobulinen (E μ) als auch vom Moloney-Virus-Enhancern (Mo-LTR). Kürzlich wurde gezeigt, daß die E μ /Mo-LTR-abhängige Überexpression des bmi-Gens, welches gemeinsam mit HEZ-2 zur Pc-Gruppe negativer Chromatinregulatoren zählt, ausreicht in transgenen Mäusen Lymphome zu erzeugen (Alkema et al., 1995).

Indem in "loss-of-function"-Analysen die endogenen Maus-Loci für HEZ-2 und H3-9 durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen unterbrochen werden, kann bestimmt werden, ob der Verlust der in vivo-Genfunktion zu einer abnormalen Entwicklung der Maus führt.

Aufgrund dieser in vivo-Systeme kann die Wirkung von HEZ-2 und H3-9 bestätigt werden; diese Systeme dienen außerdem als Grundlage für Tierversuche im Hinblick auf eine humane Gentherapie.

Der gentherapeutische Einsatz der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder davon abgeleiteter Sequenzen (z. B. komplementärer Antisenseoligonukleotide) erfolgt — je nachdem, ob die zu behandelnde Erkrankung auf eine Deregulation von Chromatin infolge des Fehlens der funktionellen Gensequenz, oder aber infolge einer Überexpression der entsprechenden Gene oder durch Reaktivierung eines Pseudogens zurückzuführen ist — durch Einführung der funktionellen Gensequenz, durch Inhibierung der Genexpression, z. B. mit Hilfe von Antisenseoligonukleotiden, oder durch Einführung einer für eine dominant-negative Mutante kodierenden

Sequenz. Die Einführung der jeweiligen DNA-Sequenzen in die Zelle kann mit Hilfe von Standardmethoden für die Transfektion höherer eukaryotischer Zellen erfolgen, zu denen der Gentransfer mittels viraler Vektoren (Retrovirus, Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus) oder mittels nicht-viralen Systemen auf Basis der Rezeptor-vermittelten Endozytose zählen; Übersichten über gebräuchliche Methoden werden z. B. von Mitani und Caskey, 1993; Jolly, 1994; Vile und Russell, 1994; Tepper und Mule, 1994; Zatloukal et al., 1993, WO 93/07283 gegeben.

Für eine Inhibierung der Expression der erfindungs-gemäßen Gene kommen auch niedermolekulare Substanzen in Betracht, die in die Transkriptionsmaschine eingreifen; nach Analyse der 5'-regulatorischen Region der Gene kann nach Substanzen gescreent werden, die die Wechselwirkung der jeweiligen Transkriptions-faktoren mit dieser Region ganz oder teilweise blockieren, z. B. mit Hilfe der in der WO 92/13092 beschriebenen Methode.

Eine Inhibierung der deregulierten Proliferation kann auch am Genprodukt ansetzen, indem die entsprechenden Antikörper gegen das HEZ-2- oder H3-9-Protein, vorzugsweise humane oder humanisierte Antikörper, therapeutisch eingesetzt werden. Die Herstellung solcher Antikörper erfolgt nach bekannten Methoden, wie sie z. B. von Malavi und Albertini, 1992, oder von Rhein, 1993, beschrieben wurden.

Antikörper gegen HEZ-2 oder H3-9, die therapeutisch oder diagnostisch verwendet werden können, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Figurenübersicht

- Fig. 1 Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen HEZ-2 und E(z),
- Fig. 2 Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen H3-9 und Su(var)3-9,
- Fig. 3 Aberrante Transkripte von humanen SET-Domäne-Genen,
- Fig. 4 Evolutionäre Konservierung von SET-Domäne-Proteinen,
- Fig. 5 Aminosäure-Übereinstimmung in der SET-Domäne,
- Fig. 6 DNA-Sequenz von HEZ-2,
- Fig. 7 DNA-Sequenz von H3-9,
- Fig. 8 Sequenzvergleich zwischen den cDNAs von humanem HEZ-2 und REZ-1.

Beispiel

a) Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Es wurde eine humane B-Zell-spezifische cDNA-Bibliothek, wie von Bardwell und Treisman, 1994, beschrieben, hergestellt, indem Poly(A)⁺-RNA aus humanen BJA-2-B-Zellen isoliert, mittels Poly(dT)₁₂-Priming revers transkribiert und in doppelsträngige cDNA konvertiert wurde. Nach Zugabe eines EcoRI-Adapters der Sequenz 5' AATTCTCGAGCTCGTCGACA wurde die cDNA in die EcoRI-Stelle des Bakteriophagen λ gt10 ligiert. Die Propagierung und Amplifizierung der Bibliothek erfolgte in EcoI C600.

b) Herstellung von DNA-Sonden

Drosophila-DNA-Sonden, kodierend für die konservierten SET-Domänen von E(z) und Su(var)3-9, wur-

den auf der Grundlage der publizierten Drosophila-Sequenzen (Jones und Gelbart, 1993; Tschiersch et al., 1994) mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) hergestellt: 1 μ g von Drosophila melanogaster-DNA (Clontech) wurde mit den beiden Primern E(z) 1910 (5' ACTGAATTCGGCTGGGGCATCTTCTTAAAG) und E(z) 2280 (5' ACTCTAGACAATTTCGATTTCACGGCTCTAT) einer PCR-Amplifikation (35 Zyklen zu 30 sek bei 94°C, 30 sek bei 55°C und 30 sek bei 72°C) unterworfen. Die entsprechende SET-Domäne-Sonde für Su(var)3-9 wurde von 10 ng Plasmid-DNA (Tschiersch et al., 1994; Klon M4) mit dem Primerpaar suvar-up (5' ATATAGTACTTCAAGTCATTCAAAGAGG) und suvar-dn (5' CCAGGTACCGTGGTGGTCTGTTTAAAGACCG) amplifiziert, wobei dieselben Zyklusbedingungen verwendet wurden. Die erhaltenen SET-Domäne-DNA-Fragmente wurden Gel-gereinigt und teilsequenziert, um die Richtigkeit der amplifizierten Sequenzen zu bestätigen.

c) Screenen der cDNA-Bibliothek

5 \times 10⁶ Plaque-bildende Einheiten ("plaque forming units", pfu) wurden mit 5 ml Kultur des bakteriellen Wirtstammes E. coli C600 (bei einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0,5 in 10 mM MgSO₄ suspension) bei 37°C 15 min lang inkubiert und dann auf eine große (200 mm \times 200 mm) vorgewärmte LB-Schale ausgegossen. Nach Wachstum über Nacht bei 37°C wurden die Phagen auf einer Nylonmembran (GeneScreen) absorbiert. Die Membran wurde, die Seite mit den absorbierten Phagen nach oben schauend, 30 sek lang in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) schwimmen gelassen, dann 60 sek in Denaturierungslösung eingetaucht und abschließend 5 min lang in 3 M NaCl, 0,5 M Tris pH 8, neutralisiert. Dann wurde die Membran kurz in 3 \times SSC gespült und die Phagen-DNA mittels UV-Vernetzung auf die Nylonfilter fixiert. Das Filter wurde 30 min lang bei 50°C in 30 ml Church-Puffer (1% BSA, 1 mM EDTA und 0,5 M NaH₂PO₄, pH 7,2) prähybridisiert, anschließend wurden 2 \times 10⁶ cpm der radioaktiv markierten DNA-Sondenmischung (E(z)-SET und Su(var)3-9-SET) zugegeben; die DNA-Sonden wurden durch Random-priming unter Verwendung des RediPrime-Kit (Amersham) hergestellt. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 50°C durchgeführt. Nach Entfernung der Hybridisierungslösung wurde das Filter 10 sek in 2 \times SSC, 1% SDS bei Raumtemperatur gewaschen, anschließend wurde 10 sek lang bei 50°C gewaschen. Das Filter wurde in Saranwrap gewickelt und unter Verwendung einer Verstärkerfolie der Autoradiographie unterworfen.

Positive Phagenkolonien wurden auf der Originalplatte mittels Zuordnung des Autoradiogramms identifiziert und die entsprechenden Agarstückchen mit dem größeren Ende einer Pasteur-Pipette entfernt. Der Phagen-Pool wurde über Nacht bei 4°C in 1 ml SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄·H₂O, 50 ml Tris pH 7,5, 5 ml 2%ige Gelatine auf 1 l H₂O), enthaltend einige Tropfen CHCl₃, eluiert. Das Phagenlysat wurde für eine zweite und dritte Screeningrunde wieder appliziert um einzelne, gut isolierte positive Plaques (20 bis 100 Plaques pro Platte in der dritten Runde) zu erhalten.

d) Sequenzanalyse

Die cDNA-Inserts von rekombinanten Phagen wurden in den Polylinker von pBluescript KS (Stratagene)

subkloniert und auf einem automatisierten Sequenzer (Applied Biosystems) unter Verwendung der Dideoxy-Methode sequenziert. Die komplette Sequenz von wenigstens zwei unabhängigen Isolaten pro erhaltenen Gen wurde mittels "Primer walking" ermittelt. Die Sequenzen wurden mit dem GCG-Software-Paket (University of Wisconsin) analysiert, die Untersuchung auf Homologie wurde mit dem "Blast und fasta" oder "fasta" Netzwerkservice durchgeführt. Die kompletten Sequenzen von HEZ-2 und H3-9 sind in Fig. 6 und 7 dargestellt.

Literatur

- Adams et al, 1992, *Genes & Dev.* 6, 1589—1607. 15
 Alkema et al, 1995, *Nature* 374, 724—727.
 Allshire et al, 1994, *Cell* 76, 157—169.
 Bardwell und Treisman, 1994, *Genes & Dev.* 8, 1644—1677.
 Brunk et al, 1991, *Nature* 353, 351—355. 20
 Buck und Shore, 1995, *Genes & Dev.* 9, 370—384.
 Cleary, 1991, *Cell* 66, 619—622.
 Counter et al, 1992, *Embo J.* 11, 1921—1928.
 DeCamillis et al, 1992, *Genes & Dev.* 6, 223—232.
 Eisenberg et al, 1992, *Genetics* 131, 345—352. 25
 Friedman et al, 1994, *Cancer Research* 54, 6374—6382.
 Garzino et al, 1992, *Embo J.* 11, 4471—4479.
 Geraghty et al, 1993, *Genomics* 16, 440—446.
 Gibbons et al, 1995, *Cell* 80, 837—845. 30
 Gu et al, 1992, *Cell* 71, 701—708.
 Haupt et al, 1991, *Cell* 65, 753—763.
 Jolly, D., 1994, *Cancer Gene Therapy* 1, 51.
 Jones und Gelbart, 1993, *MCB* 13 (10), 6357—6366.
 Kennedy et al, 1995, *Cell* 80, 485—496. 35
 Locke et al, 1988, *Genetics* 120, 181—198.
 Malavsi, F. und Albertini, A., 1992, *TIBTECH* 10, 267—269.
 Messmer et al, 1992, *Genes & Dev.* 6, 1241—1254.
 Milner und Campbell, 1993, *Biochem. J.* 290, 811—818. 40
 Mitani, K. und Caskey, C.T., 1993, *Trends in Biotechnology* 11, 162—166.
 Nomura et al, 1994, Unpublished, GeneBank accession number: D31891.
 Orlando und Paro, 1993, *Cell* 75, 1187—1198. 45
 Pardue, 1991, *Cell* 66, 427—431.
 Rastelli et al, 1993, *Embo J.* 12, 1513—1522.
 Renaud et al, 1993, *Genes & Dev.* 7, 1133—1145.
 Reuter und Spierer, 1992, *BioEssays* 14, 605—612.
 Rhein, R., 1993, *The Journal of NIH Res.* 5, 40—46. 50
 Smouse und Perrimon, 1990, *Dev. Biol.* 139, 169—185.
 Solomon et al, 1991, *Science* 254, 1153—1160.
 Tepper, R.L. und Mule, J.J., 1994, *Human Gene Therapy* 5, 153.
 Tkachuk et al, 1992, *Cell* 71, 691—700. 55
 Tschiersch et al, 1994, *Embo J.* 13 (16), 3822—3831.
 Vile, R. und Russel S., 1994, *Gene Therapy* 1, 88.
 Zatloukal, K., Schmidt, W., Cotten, M., Wagner, E., Stingl, G. und Birnstiel, M.L., 1993, *Gene* 135, 199. 60
- Patentsprüche
1. DNA-Moleküle, enthaltend eine für ein Chromatinregulator-Protein, das eine SET-Domäne aufweist, kodierende Sequenz oder eine Teilsequenz davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in Fig. 6, Fig. 7 oder Fig. 8 dargestellte Nukleotidsequenz, kodierend für HEZ-2, H3-9 oder HEZ-1, einschließlich ihrer degenerierten Varianten sowie Mutanten davon, enthalten.
 2. DNA-Molekül nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es eine cDNA ist.
 3. DNA-Molekül nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es humanen Ursprungs ist.
 4. cDNA nach Anspruch 3 der Bezeichnung HEZ-2.
 5. cDNA nach Anspruch 3 der Bezeichnung H3-9.
 6. DNA-Molekül nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es die für die SET-Domäne von HEZ-2 kodierende Region oder einen Abschnitt davon enthält.
 7. DNA-Molekül nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es die für die SET-Domäne H3-9 kodierende Region oder einen Abschnitt davon enthält.
 8. DNA-Molekül nach Anspruch 4, dadurch daß es für eine dominant-negative Mutante von HEZ-2 kodiert.
 9. DNA-Molekül nach Anspruch 4, dadurch daß es für eine dominant-negative Mutante von H3-9 kodiert.
 10. Rekombinantes DNA-Molekül, enthaltend eine in Anspruch 2 definierte cDNA, funktionell verbunden mit Expressionskontrollsequenzen, zur Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen.
 11. Prokaryotische oder eukaryotische Wirtsorganismen, transformiert mit rekombinanten DNA nach Anspruch 10.
 12. Rekombinantes humanes Chromatinregulator-Protein HEZ-2 oder ein Abschnitt davon, erhältlich durch Expression einer in Anspruch 4 definierten cDNA.
 13. Rekombinantes humanes Chromatinregulator-Protein H3-9 oder ein Abschnitt davon, erhältlich durch Expression einer in Anspruch 5 definierten cDNA.
 14. Antikörper gegen HEZ-2.
 15. Antikörper gegen H3-9.
 16. Antisense(desoxy)ribonukleotide mit Komplementarität zu einer Teilsequenz einer in Anspruch 1 definierten DNA.
 17. DNA-Molekül, kodierend für die SET-Domäne eines Chromatinregulator-Gens, bzw. für einen Abschnitt davon, zur Behandlung und Diagnose von Erkrankungen des Menschen, die auf eine Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, zurückzuführen sind.
 18. DNA-Molekül nach Anspruch 6 oder 7 zur Behandlung und Diagnose von Erkrankungen des Menschen, die auf eine Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, zurückzuführen sind.
 19. Antikörper nach Anspruch 14 oder 15 zur Behandlung und Diagnose von Erkrankungen des Menschen, die auf eine Deregulation von Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, zurückzuführen sind.
 20. Transgene Maus, enthaltend ein Transgen für die Expression eines Chromatinregulator-Gens, das eine SET-Domäne aufweist, oder einer mutierten Version eines solchen Proteins.
 21. Transgene Maus, erhältlich aus embryonalen Stammzellen, in denen die endogenen Maus-Loci für HEZ-2 und H3-9 durch homologe Rekombination unterbrochen wurden.
 22. Verfahren zum Identifizieren von Säugtier-

Chromatinregulator-Genen, die eine SET-Domäne aufweisen, oder mutierten Versionen davon, dadurch gekennzeichnet, daß man Säugetier-cDNA- oder genomische DNA-Bibliotheken unter Bedingungen niedriger Stringenz mit einem DNA-Molekül, kodierend für die SET-Domäne oder einen Abschnitt davon, hybridisiert.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 2

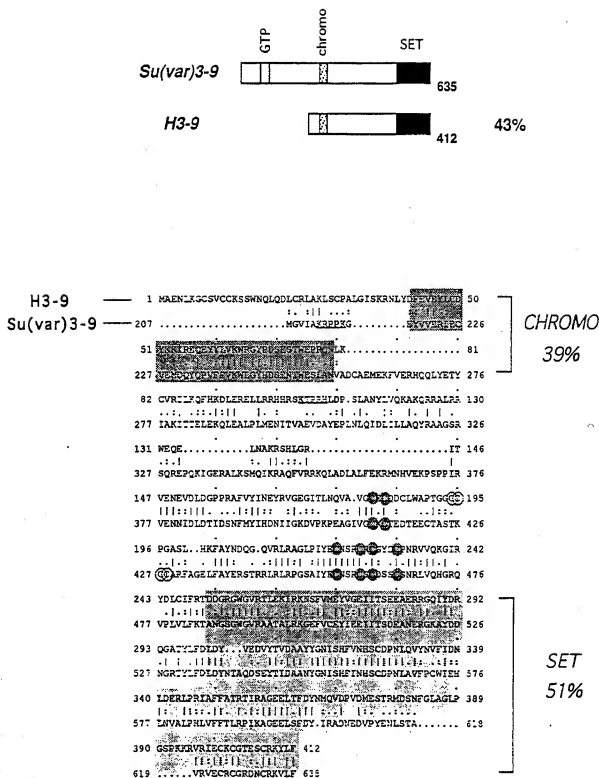


Fig. 3

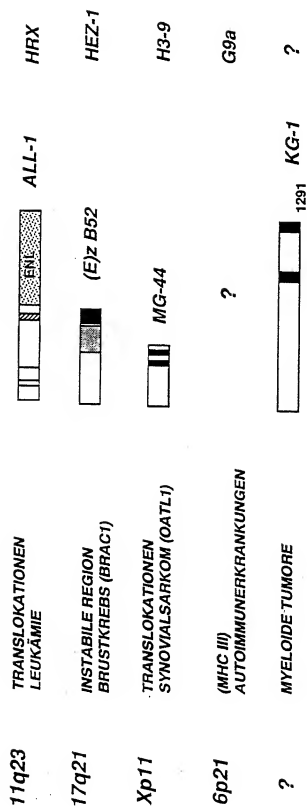
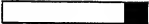
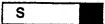




Fig. 4


S. CEREVISIAE YHR119  1080

C. ELEGANS C26E6.10  739

DROSOPHILA M.

trx  3751

E(z)  760

Su(var)3-9  635

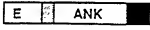
T
E
S

SÄUGETIERE

HMG 1/2
HRX  3969 46%

HEZ-2  746 61%

H3-9  412 43%

G9a  1001

HMG-1

?

Fig. 5

```

E(z)  SDIAGWGIFL  KEGAQKNEFI  SEYCGEIIHQ  DEADRRGKVY  DK..YMC5FL  50
HEZ    SDVAGWGIFI  KDPVQKNEFI  SEYCGEIIHQ  DEADRRGKVY  DK..YMC5FL

HRX    SPTHGAGLFC  KRNI DAGEMV  IYAGAVTAS  IQTDKREKTY  DSKSIG.CYM
ttx    SHIHGAGLVC  KNDI DAGEMV  IYAGAVTAS  ITDREKRETY  DSAGIG.CYM
C26    SRHHGAGLYA  HESIAPEMI  VEYIGQTRIS  IYAEERKAY  ERAGIGSSYL
YHR    SAHNWGLYA  LDSIAAKEMI  IYVGERITQ  PVAEMREKRY  LKNIGSSYL

su3-9  ANGSGWGVRA  ATALRKGEFV  CEKLEELITS  DEANERKRAY  DDNG..RTYL
H3-9   DDGSGWGVRT  LEKIRKNSFV  MEIVGEIITS  EEAERGGQLY  DRQG..ATYL
G9a    TAKSGWGVRA  LQTIPOGTFI  CEIVGELISD  AEAD..V..  .RED..DSYL
KG-1   TQNKGGGIRC  LODIANGSFV  CIYAGKIITD  DFADKEGL  .EMG..DEYF

E(z)   FNIN.....  NDFVVDATRK  GNKIRFANHS  INPNCYAKVM  MVNGDH....  10C
HEZ     FNIN.....  NDFVVDATRK  GNKIRFANHS  VNPNCYAKVM  MVNGDH....

HRX     FRID.....  DSEVVDATMH  GNRAREINHS  CEPNCYSRVI  NIDGQK....
ttx     FKID.....  DNLVVDATMR  GNAAREINHC  CERNCSYKVV  DILGSH....
C26     FRID.....  LRHVVIDATKR  GNFAREINHS  CQPNCSYAKVL  TIEGEK....
YHR     FRVD.....  ENTVIDATKK  GGIAREINHC  CDPNCTAKII  KVGGRR....

Su3-9   FDLDYNTAQD  SEYTTDAANY  GNISHEINHS  CDPNLAVFPC  WIEELINVALP
H3-9    FDLDY...VE  DVTYVDAAYY  GNISHEVNHS  CDPNLQVQVY  FIDHIDLEALP
G9a     FDLDNK..DG  EVCYIDARYY  GNISREINHL  CDPNHIIPRVV  FMLHQDLAFP
KG-1    ANLDHI..ES  VEYIIDARLE  GNLGKYLNS  CSPNLFVCNV  FVTHDLAFP

E(z)    RIGIFAKRAI  CPGEELTFDY  ..RYGPTEQL  K.....FVGI  EREMEIV*  15C
HEZ      RIGIFAKRAI  QTGEELTFDY  ..RYSQADAL  K.....YVGI  EREMEIP*

HRX     HIVIFAMKRI  YRGEELTYDY  ..KFPFE.DA  SNKLPCSCGA  KRCRKEFLN*
ttx     HLIIFAVERI  VQGEELTYDY  ..KFPFE.DA  EKIPSCSGS  KRCRKYVLN*
C26     RIVIVSRITII  KQGEELTYDY  ..KFPFE...  DDKIDCLCGA  KTCRAGYLN*
YHR     RIVIVALRDI  AASEELTYDY  ..KFEREKDD  EERLPCLCGA  PNCKRGLN*

Su3-9   HLVEFTLRPI  KAGEELSFDY  .IRADNEDVP  YENLSTA.  .....
H3-9    RIAFFATRTI  RAGEELTFDY  NMQVDPVDME  STRMDSNFL  AGLGSGPKKR
G9a     RIAFFESRDI  RTGEELGFDY  GDRFW..DIK  SKYFTCCQGS  EKCKSHAEAI
YG-1    WVAFFASKRI  RAGTELCWDY  NYZEVG..SVE  GKELLCCCGA  IECR.....

E(z)
HEZ

HRX
ttx
Z6
YHR

Su3-9   VRVECRGGRD  NCRKYL*
H3-9    VRIECKCOTE  SCRKYLF*
G9a     ALEQSRALARL  DPHPELLPEL  GSLPPVNT*
KG-1    ....GALL*

```

Fig. 6/1

HEZ-2 Length: 2607bp (CODING: 90-2330)

```

1  AGGCAGTGGG GCCCGCGCGG CGCGCGCGGG GCGACGCGCG
51  GGGAAACAACG CGAGTCGGCG CGCGGGACGA AGAATAATCAM TGGCCAGAC
101 TGGGAAGAAA TCTGAGAAGG GACCAGTTTG TTGGCGGAAG CGTGTAAAAT
151 CAGAGTACAT GCGACTGAGA CAGCTCAAGA GGTTCAGACG AGCTGATGAA
201 GTAAAGAGTA TGTTTAGTTC CAATCGTCAG AAAATTTTGG AAAGAACGGA
251 AATCTTAAAC CAAGAATGGA AACAGCGAAG GATACAGCCT GTGCACATCC
301 TGACTTCTGT GAGCTCATTG CGCGGGACTA GGGAGTGTTT GGTGACCAGT
351 GACTTGGATT TTCCAACACA AGTCATCCCA TTAAGAGCTC TGAATGCAGT
401 TGCTTCAGTA CCCATAATGT ATTCTTGGTC TCCCCTACAG CAGAAATTTA
451 TGGTGAAGA TGAAACTGTT TTACATAACA TTCCTTATAT GGGAGATGAA
501 GTTTTAGATC AGGATGGTAC TTTCAATGAA GAACTAATTA AAAATTTATGA
551 TGGGAAGATA CACGGGGATA GAGAATGTGG GTTTATAAAT GATGAAATTT
601 TTGTGGAGTT GGTGAATGCC CTTGGTCAAT ATAATGATGA TGACGATGAT
651 GATGATGAG AGGATCCTGA AGAAGAGAGG GAAAGCAGA AAGATCTGGA
701 GGATCACCGA GATGATAAAG AAAGCCGCCC ACCTCGGAGA TTCTCTCTTG
751 ATAAATTTT TGAAGCCATT TCCTCAATGT TTCCAGATTA GGGCACAGCA
801 GAAGAAGTAA AGGAAAAATA TAAAGAACTC ACCGAACAGC AGCTCCAGG
851 CGCACTTCCT CCTGAATGTA CCCCACATAT AGATGGACCA AATGCTAAAT
901 CTGTTCAGAG AGAGCAAAGC TTACACTCCT TTCATACGCT TTTCTGTAGG
951 CGATGTTTTA AATATGACTG CTTCTACAT CTTTTCATG CAACACCCAA
1001 CACTTATAAG CGGAAGAACA CAGAAACAGC TCTAGACACG AAACCTTTTG
1051 GACCACAGTG TTACCAGCAT TTGGAGGGAG CAAAGGAGTT TGCTGCTGCT
1101 CTCACCGCTG AGCGGATAAA GACCCACCA AAACGTCCAG GAGGCGCGAG
1151 AAGAGGACGG CTTCCCAATA ACAGTAGCAG GCCCAGCAAT CCCACCAATA
1201 ATGTGCTGGA ATCAAGGAT ACAGACAGTG ATAGGGAAGC AGGAGATGAA
1251 ACGGGGGGAG AGAACAATGA TAAAGAGAGG GAAGAGAAGA AAGATGAATC
1301 TTGAGAGTCC TCTGAAGCAA ATTCTCGGTG TCAACACCA ATAAAGATGA
1351 AGCCAAATAT TGAACCTCCT GAGAATGTGG AGTGAATGTT TGTTGAATCC

```

Fig. 6/2

1401 TCAATGTTTA GAGTCCTCAT TGGCACTTAC TATGACAATT TCTGTGCCAT
1451 TGCTAGGTTA ATTGGGACCA AAACATGTAG ACAGGTGTAT GAGTTTAGAG
1501 TCAAAGAATC TAGCATCATA GCTCCAGCTC CGCGTGAGGA TGTGATACT
1551 CCTCCAAGGA AAAAGAAGAG GAAACACCGG TTGTGGGCTG CACACTGCAG
1601 AAAGATACAG CTGAAAAGG ACGGCTCCTC TAACCATGTT TACAACTATC
1651 AACCCGTGTA TCATCCAAGG CAGCCTTGTG ACAGTTCGTG CCCTTGTGTG
1701 ATAGCACAAA ATTTTGTGTA AAAGTTTGT CAATGTAGTT CAGAGTGTC
1751 AAACCGCTTT CCGGGATGCC GCTGCAAAGC ACAGTGCAAC ACCAAGCAGT
1801 GCCCGTGCTA CCTGGCTGTC CGAGAGTGTG ACCCTGACCT CTGCTTACT
1851 TGTGGAGCCG CTGACCATTG GGACAGTAAA AATGTGCCT GCAAGAAGT
1901 CAGTATTGAG CGGGGCTCCA AAAAGCATCT ATTGTGGCA CCATCTGACG
1951 TGGCAGGCTG GGGGATTTTT ATCAAAGATC CTGTGCAGAA AATGAATTC
2001 ATCTCAGAA CTGTGGAGA GATTATTTCT CAAGATGAAG CTGACAGAAG
2051 AGGGAAAGTG TATGATAAAT ACATGTGCAG CTTTCTGTTT AACTTGAACA
2101 ATGATTTTGT GGTGGATGCA ACCCGCAAGG GTAACAAAAT TCGTTTTGCA
2151 AATCATTCGG TAAATCCAAA CTGCTATGCA AAAGTTATGA TGGTTAACGG
2201 TGATCACAGG ATAGGTATTT TTGCCAAGAG AGCCATCCAG ACTGCGAAG
2251 AGCTGTTTTT TGATTACAGA TACAGCCAGG CTGATGCCCT GAAGTATGTC
2301 GGCATCGAAA GAGAAATGGA AATCCCTTGA CATCTGCTAC CTCCTCCCCC
2351 TCCTCTGAAA CAGTCGCCTT AGCTTCAGGA ACCTCGAGTA CTGTGGGCAA
2401 TTTAGAAAAA GAACATGCAG TTTGAAATTC TGAATTTGCA AAGTACTGTA
2451 AGRATAATTT ATAGTAATGA GTTTAAAAAT CAACTTTTTA TTGCTTCTC
2501 ACCAGCTGCA AAGTPTTTG TACCAGTGAA TTTTGTCAAT AATGCAGTAT
2551 GGTACATTTT TCAACTTTGA ATAAGAATA CTGAACTTG TCAAAAAAAA
2601 TGTCGAC

Fig. 7/1

H3-9 LENGTH: 2747bp (CODING: 53-1291)

```

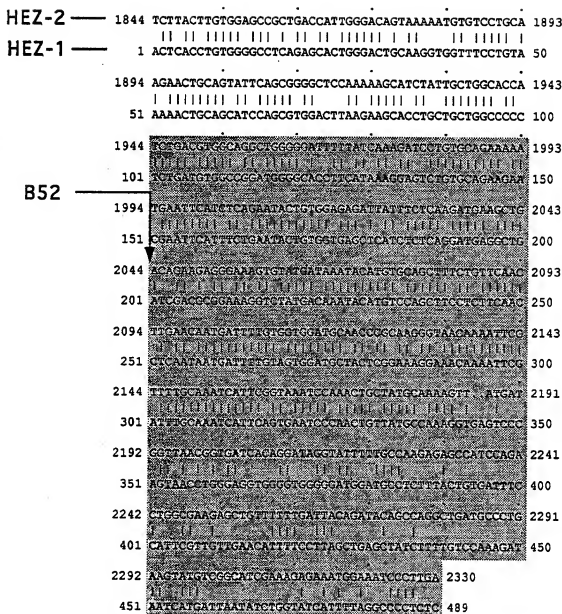
1  GTCGACACTC GCGAGGCCGG CTAGCCCCGA ATGTGTTAG CCGTGGGGAA
   M
51  AGATGGCGGA AAATTTAAAA GGCTGCAGCG TGTGTTGCAA GTCTTCTTGG
101 AATCAGCTGC AGGACCTGTG CCGCCTGGCC AAGCTCTCCT GCCCTGCCCT
151 CGGTATCTCT AAGAGGAACC TCTATGACTT TGAAGTCGAG TACCTGTGCG
201 ATTACAAGAA GATCCGCGAA CAGGAATATT ACCTGGTGAA ATGGCGTGGA
251 TATCCAGACT CAGAGAGCAC CTGGGAGCCA CGGCAGAATC TCAAGTGTGT
301 GCGTATCCTC AAGCAGTTCC ACAAGGACTT AGAAGGGGAG CTGCTCCGGC
351 GGCACCACCG GTCAAAGACC CCCCGGCACC TGGACCCAAg CTTGGCCAAc
401 TACCTGGTGC AGAAGGCCAA GCAGAGCGCG CGCCTCCGTC GCTGGGAGCA
451 GGAGCTCAAT GCCAAGCGCA GCCATCTGGG ACGCATCACT GTAGAGAATG
501 AGGTGGACCT GGACGGCCCT CCGCGGGCCT TCGTGTACAT CAATGAGTAC
551 CGTGTGTGGT AGGGCATCAC CCTCAACCAG GTGGCTGTGG GCTGCGAGTG
601 CCAGGACTGT CTGTGGGCAC CCACTGGAGG CTGCTGCCCG GGGGCGTCAC
651 TGCACAAGTT TGCTACAAT GACCAGGGCC AGGTGCGGCT TCGAGCCGGG
701 CTGCCCATCT ACGAGTGCAA CTCCGCTGCG CGCTGCGGCT ATGACTGCCC
751 AAATCGTGTG GTACAGAAAG GTATCCGATA TGACCTCTGC ATCTTCCGGA
801 CGGATGATGG GCGTGGCTGG GCGTCCGCA CCCTGGAGAA GATTGCGAAG
851 AACAGCTTCG TCATGGAGTA CGTGGGAGAG ATCATTACCT CAGAGGAGGC
901 AGAGCGGCGG GGCCAGATCT ACGACCGTCA GGGCGCCACC TACCTCTTTG
951 ACCTGGACTA CGTGGAGGAC GTGTACACCG TGGATGCCCG CTACTATGGC
1001 AACATCTCCC ACTTTGTCAA CCACAGTTGT GACCCCAACC TGCAGGTGTA
1051 CAACGTCTTC ATAGACAACC TTGACGAGCG GCTGCCCCGC ATCGCTTTCT
1101 TTGCCCAAAG AACCATCCGG GCAGGCGAGG AGCTCACCTT TGATTACAAC
1151 ATGCAAGTGG ACCCCGTGGA CATGGAGAG ACCCGCATGG ACTCCAACCT
1201 TGGCCTGGCT GGGCTCCCTG GCTCCCTAA GAAGCGGGTC CGTATTGAAT
1251 GCAAGTGTGG GACTGAGTCC TGCCGCAAA ACCTCTTCTA GCCCTTAGAA
1301 GTCTGAGGCC AGACTGACTG AGGGGGCCTG AAGCTACATG CACCTCCCCC
1351 ACTGCTGCCC TCCTGTGAG AATGACTGCC AGGGCCTCGC CTGCTCCGAC

```


Fig. 7/2

1401 CTGCCCCAC CTGCTCCTAC CTGCTCTACG TTCAGGGCTG TGGCCGTGGT
1451 GAGGACCGAC TCCAGGAGTC CCCTTTCOCT GTCCAGCCCC CATCTGTGGG
1501 TTGCACCTAC AAACCCCCAC CCACCTTCAG AAATAGTTTT TCAACATCAA
1551 GACTCTCTGT CGTTGGGATT CATGGCCTAT TAAGGAGGTC CAAGGGGTGA
1601 GTCCCAACCC AGCCCCAGAA TATATTGTGT TTTGCACCTG CTTCTGCCTG
1651 GAGATTGAGG GGTCTGTCTG AGGCCTCCTC CCTGCTGCCC CAAAGGTATG
1701 GGAAGCAAC CCCAGAGCAG GCAGACATCA GAGGCCAGAG TGCCTAGCCC
1751 GACATGAAGC TGGTTCCCA ACCACAGAAA CTTGTACTA GTGAAAGAAA
1801 GGGGTCCCTG GCCTACGGG TGAGGCTGGT TTCTGCTCGT GCTTACAGTG
1851 CTGGGTAGTG TTGGCCCTAA GAGCTGTAGG GTCTCTTCTT CAGGGCTGCA
1901 TATCTGAGAA GTGGATGCC ACATGCCACT GGAAGGGAAG TGGGTGTCCA
1951 TGGGCCACTG AGCAGTGAGA GGAAGGCAGT GCAGAGCTGG CCAGCCCTGG
2001 AGGTAGGCTG GGACCAAGCT CTGCCTTAC AGTGCAGTGA AGGTACCTAG
2051 GGCTCTGGG AGCTCTGCGG TTGCTAGGGG CCTGACCTG GGGTGTCATG
2101 ACCGTGACA CCACTCAGAG CTGGAACCAA GATCTAGATA GTCCGTAGAT
2151 AGCACTTAGG ACAAGAATGT GCATTGATGG GGTGGTGATG AGGTGCCAGG
2201 CACTAGGTAG AGCACCTGGT CCACGTGGAT TGCTTCAGGG AAGCCTTGAA
2251 AACCACGGAG GTGGATGCCA GGAAGGGCC CATGTGGCAG AAGCAAAGT
2301 ACAGGCCAAG AATTGGGGGT GGGGGAGATG GCTTCCCCAC TATGGGATGA
2351 CGAGGCGAGA GGAAGCCCT TGCTGCCTGC CATTCCAGA CCCCAGCCCT
2401 TTGTGCTCAC CCTGGTTCCA CTGGTCTCAA AAGTCACCTG CCTACAAATG
2451 TACAAAAGC GAAGTTCTG ATGGCTGCCT TGCTCCTTGC TCCCCACCC
2501 CCTGTGAGGA CTTCTCTAGG AAGTCCTTCC TGACTACCTG TGCCAGAGT
2551 GCCCCTACAT GAGACTGTAT GCCCTGCTAT CAGATGCCAG ATCTATGTGT
2601 CTGCTGTGT GTCCATCCG CCGGCCCCG AGACTAACCT CAGGTCATG
2651 ACTGAATCTG GTTCTCCTCT GTTACACCCC TCAACCTTAT GCAGCCTGGA
2701 GTGGGCATCA ATAAAAAGAA CTGTCCTACTG AAAAAAAAAA TGTCTGAC

Fig. 8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.